

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業
分担研究報告書

核酸アナログの合成

研究分担者 井本 修平（崇城大学薬学部）

研究要旨：

抗HBV活性を有する新規核酸アナログの合成を目指し、昨年度に引き続き①二重結合を有するアシクロ型ヌクレオチド誘導体、②4'位にアジド基を有するヌクレオシドの合成を行った。評価の結果、4'位にアジド基を持つヌクレオシド誘導体の一部化合物が、高い抗HBV活性を有しており、有望なリード化合物になりうる可能性が示された。

A. 研究目的

わが国におけるB型肝炎ウイルスキャリアは約150万人程度と考えられている。現在、B型肝炎の治療薬としてentecavir等が広く用いられているが、既存の薬剤に対して耐性化したHBVに対する治療薬の開発が急務となっている。そこで、本研究では、これまでのHBV治療薬よりも強力かつ耐性発現を許さない（または著しく遅延させる）新規B型肝炎治療薬の設計と合成を行うことを目的とする。

B. 研究方法

満屋グループが所有するヌクレオシド誘導体ライブラリ中で強い抗HBV活性を有する化合物、または既存のB型肝炎治療薬を基本として新規B型肝炎治療薬候補化合物の設計と合成を行なう。さらに、得られる抗HBV活性の評価結果をフィードバックして構造最適化を行っていく。

本年度は、主に以下の構造を有する化合物の合成について計画・検討を行った。（Fig. 1）

①二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体の合成

エンテカビルとアデホビルは臨床で用いられているB型肝炎治療薬である。エンテカビルは炭素環デオキシグアノシン誘導体であり、シクロペンタン環に置換した二重結合はエンテカビルの強力な抗ウイルス活性の発現に必須な構造である。一方、アデホビルはアシクロヌクレオシドホスホネートであり、アデノシンのフラノース部分の開環型誘導体であるとともに、代謝的活性化の第一段階であるモノリン酸化を必要としない構造を有している。このような背景から、昨年度、新たな

抗HBV薬として、エンテカビルとアデホビルの構造的特徴を併せ持つハイブリッド型新規ヌクレオシド誘導体(L-ala-MEB-G, **1**)を設計し、合成を行った。本年度は、新たに2種類の新規ヌクレオチド(**2,3**)の合成を計画した(Fig.1)。

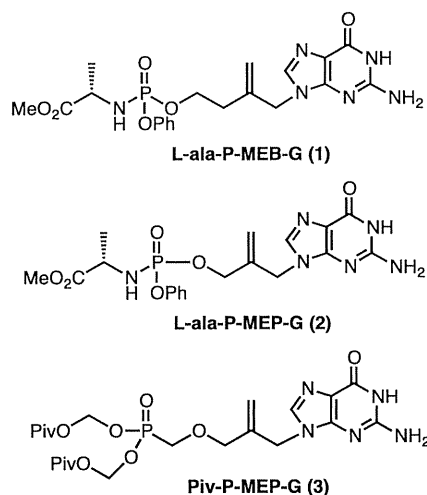


Fig. 1 二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体

②4'位にアジド基を有するヌクレオシドの合成

研究代表者である満屋教授らのグループにより開発が進められている4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine(EFdA)をはじめとして、4'位に置換基を持つヌクレオシド構造は抗ウイルス薬として注目されている。昨年度、各種デオキシヌクレオシドを出発原料として、5'水酸基をヨウ素化した後、塩基処理にてオレフィン体とし、この二重結合への付加反応で4'位アジド体の合成を行った。続いて、化合物4を用いてプリン6位置換体を合成するための合成経路を確立した(Fig.2)。

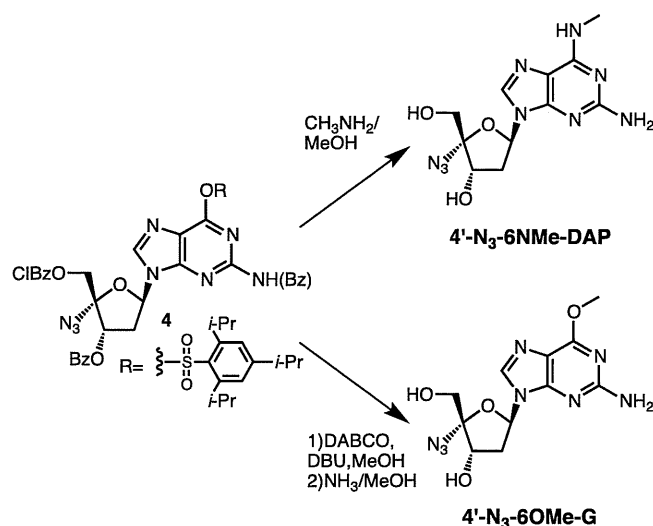


Fig. 2 4'-アジド-プリン6位置換核酸誘導体の合成

本年度は、上記経路に従ってより多くの4'-アジド-プリン6位置換体の合成を行うこととした。さらに、塩基部および糖部でのフッ素置換誘導体を合成することを計画した。

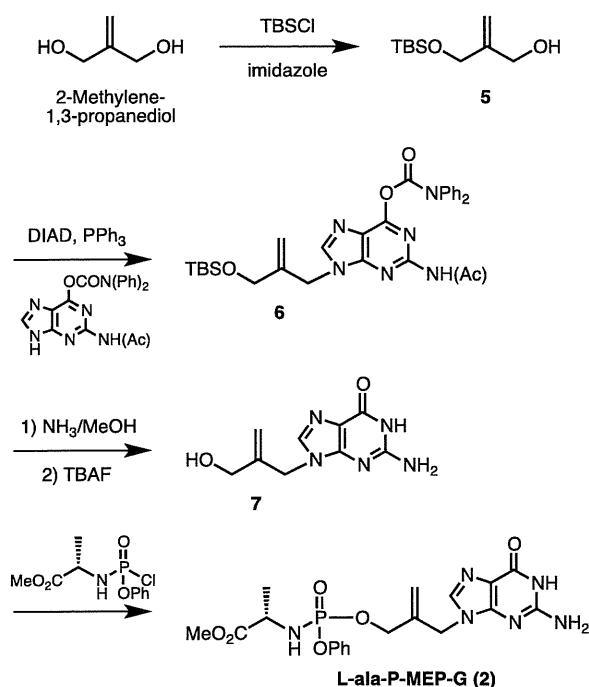
(倫理面への配慮)

研究分担者の本推進研究における担当は、有機合成であるため、倫理面の配慮には該当しない。

C. 研究結果

①二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体の合成

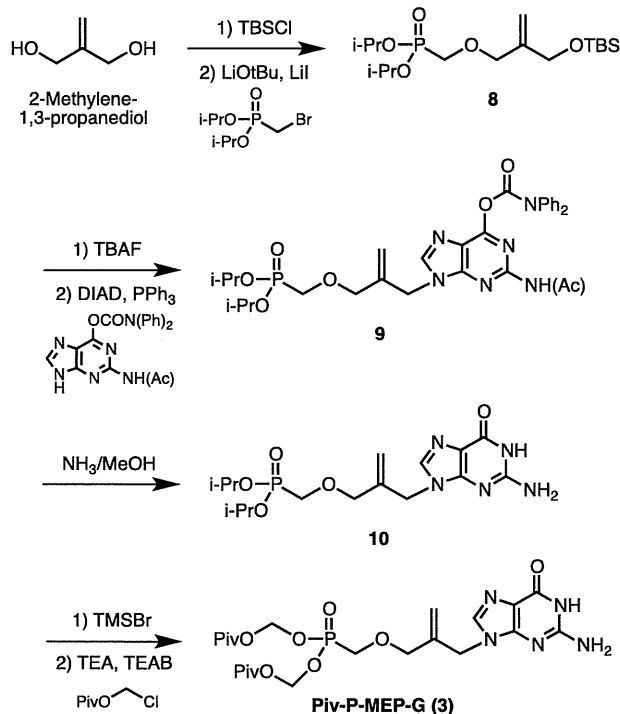
2-Methylene-1,3-propanediolを出発原料とし、以下のスキームにしたがってL-ala-P-MEP-G(2)の合成を行った。



Scheme.1 L-ala-P-MEP-Gの合成

ジオールの片方の水酸基を保護した後、光延反応によって保護されたグアニンを導入した。塩基部と水酸基の保護基をそれぞれ脱保護した後、水酸基のリン酸化を行って目的とするL-ala-P-MEP-G (2)の合成を達成した。

Piv-P-MEP-G(3)については、以下のスキームにて合成を進めた。



Scheme. 2 Piv-P-MEP-G(3)の合成

2-Methylene-1,3-propanediolをモノシリル化した後、リン酸ジエステル構造を導入した。テトラブチルアンモニウムフルオリドにて水酸基のシリル基を脱保護した後、光延反応にて塩基部を導入した。メタノール性アンモニアにより塩基部分の脱保護を行った後、引き続き、脱エステル化と得られたホスホン酸をピバリン酸クロロメチルエステルによって再エステル化することで、目的とするPiv-P-MEP-G(3)の合成を達成した。

②4'位にアジド基を有するヌクレオシドの合成

昨年度、分担者らは4'-アジド-プリン6位置換ヌクレオシド誘導体を合成する上で、有効な経路を確立することが出来た(Fig. 2)。この経路にて合成した一部の誘導体が、極めて高い抗HBV活性を示すことが確認されたため、本年度はさらにFig.3に示す誘導体の合成を行った。

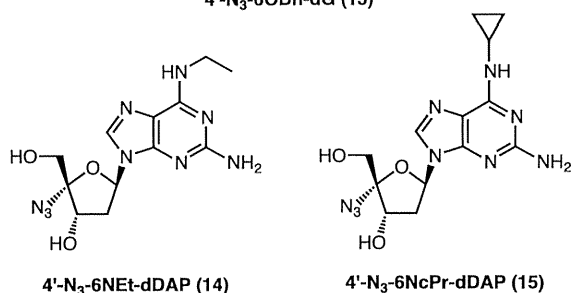
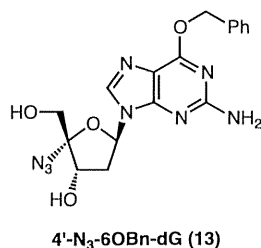
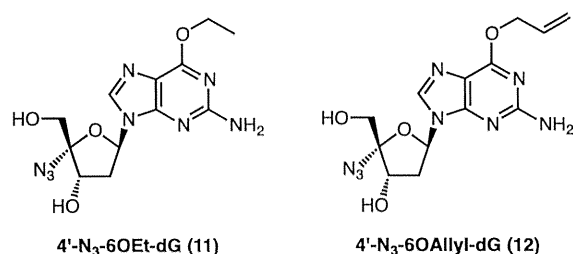
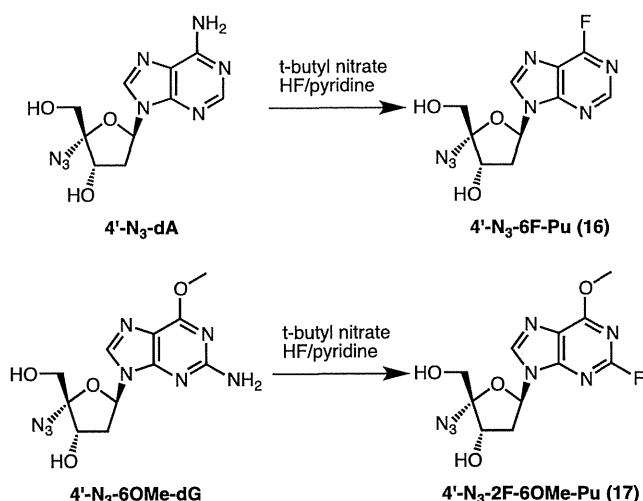


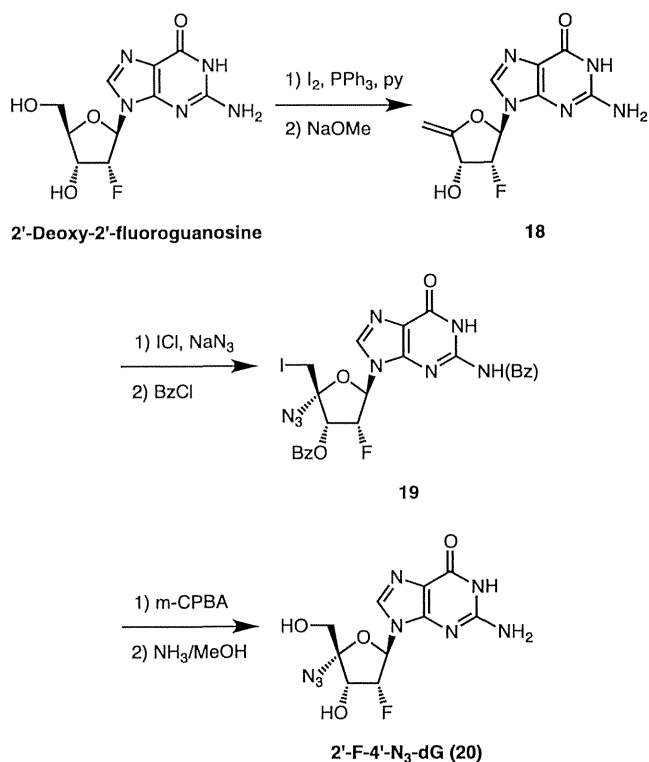
Fig. 3 4'-アジド-6位置換プリン誘導体の合成

2位がハロゲン置換されたアデニン誘導体はアデノシンデアミナーゼに対する安定性が向上することが知られている。そこで、塩基部のフッ素化を検討した。反応条件を検討した結果、収率は悪いもののHF-pyridine中で亜硝酸tert-ブチルを用いることで目的とする塩基部フッ素置換体を得ることができた(Scheme. 3)。



Scheme. 3 4'-アジド-塩基部フッ素誘導体の合成

さらに、糖部2'位フッ素置換体についても以下のスキームによって合成を行った。



Scheme. 4 2'-フッ素化4'アジドdGの合成

2'-デオキシ-2'-フルオログアノシンを出発原料とし、5'位のヨウ素化、ナトリウムメトキシドによる脱離反応を経てオレフィン体(18)とした。オレフィン体に対して系中で発生させたI_N3による付加反応を行うことで、4'位にアジド基を導入した。水酸基とエキソアミンをベンゾイル基で保護して19へと変換した後、*m*-CPBAとアンモニア性メタノールによる処理で目的とする4'-アジド-2'-フルオログアノシン(20)の合成を達成した。

E. 結論

本年度は、B型肝炎治療薬候補化合物として上記化合物の合成を達成した。抗HBV活性は熊本保健科学大学の青木博士に評価頂き、一部の化合物が高い抗HBV活性を示すことが示唆された。特に4'-アジド-6位置換プリンヌクレオシド誘導体は、系統的な合成を行った結果、6位にある程度の大きさの置換基を導入することで、毒性を大きく軽減できる可能性が示された。今後、構造最適化を行っていき、高い活性を維持したままで、毒性を低減した化合物の設計と合成を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

井本 修平, 向後 悟, 徳田 亮, 熊本 浩樹, 青木
学, 天野 将之, 鍬田 (東) 伸好, 満屋 裕明, 原口
一広 エンテカビルとアデホビルのハイブリッド
型化合物：メチレンアシクロヌクレオシド誘導体
の合成と抗HBV活性（日本薬学会第135年会 201
5/3/25-28）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新規化合物の抗ウイルス活性の評価に関する研究

研究分担者 青木 学 熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科講師

研究要旨：本研究では既存の抗HBV逆転写酵素剤阻害剤であるエンテカビルと同等かそれ以上の活性を有する新規のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤の開発・同定を目的とし、新規に合成される化合物の*in vitro*における抗HBV活性、抗HIV-1活性および細胞毒性の検討を行った。評価した11種類の化合物には抗HBV活性を示すものがあり、今後の化合物のデザイン・合成に有益な情報をもたらすものと考えられる。

A. 研究目的

本邦におけるB型肝炎ウイルス（HBV）のキャリアは人口の約1%を占めているとされ、持続感染により慢性B型肝炎、肝硬変へと病態が進行し、肝がんを発症する可能性がある。HBVに対する治療薬としては、2000年にラミブジン（3TC）が最初の核酸誘導体として認可され、次いでアデホビル、エンテカビル（ETV）が認可、2014年には4種類目としてテノホビルが臨床応用されている。一方で、HBVがこれらの薬剤に対して耐性を獲得する等の問題があり、特に先行して臨床応用された3TCに対する耐性ウイルスが比較的早期にETVに耐性を獲得することが知られていることから、既存の薬剤に耐性となったウイルスにも高い活性を発揮し、且つ耐性プロフィールが全く異なるなどの新規化合物の開発が必須である。本研究では、本研究プロジェクトの新規化合物のデザイン・合成を担当する研究分担者より供給される新規化合物について、*in vitro*における抗HBV活性と細胞毒性を

測定し、既存の薬剤と比較評価を行う。また本研究で開発を目指すヌクレオシド誘導体は、HBVがウイルスRNAからcDNAを合成するために必須の酵素である逆転写酵素の活性を阻害するものであるが、HIVが有する逆転写酵素の反応も同様に阻止するものも存在することから、抗HIV活性についても同様に評価を行う。その中から細胞毒性が良好で且つETV等の既存の薬剤と同等かより強力な活性を有する有望な化合物については、更に薬剤耐性HBVに対する活性を測定、また既存の薬剤と比較して耐性ウイルスが発現し易いかどうか（genetic barrier）等の検討も行う。また抗ウイルス活性等の一連のデータについては、化合物の合成を行なう研究分担者に速やかにフィードバックし更に化合物の再デザイン・最適化を加速させる。

B. 研究方法

1) 新規化合物の抗HBV活性の評価：
96-well plateにて新規化合物を10%FCS+

DMEM で 1 μM から段階希釈し、次に持続的に HBV を産生する HepG2.2.15 細胞を $1 \times 10^5/\text{ml}$ で播種、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 6 日間培養した。培養上清中の HBV DNA を QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) で抽出・精製し、DNA 濃度を測定、50 ng 中の HBV DNA 量を real-time PCR (LightCycler, Roche) で検出、算出した。Primer は HBV の逆転写酵素遺伝子内に設計、試薬は SYBR Green を用いた。化合物非存在下での培養上清中の HBV DNA 量と比較し IC_{50} 値を算出した。

2) 化合物の細胞毒性の検討：細胞はヒト $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞である MT-2 細胞を用い、MTT assay にて評価を行なった。96-well plate で化合物を 10%FCS+ RPMI で 100 μM から段階希釈し、次いで $2 \times 10^4/\text{ml}$ の MT-2 細胞を添加、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 7 日間培養した。MTT 試薬 (nacalai tesque) を添加後に 2 時間インキュベート、可溶化溶液を添加し細胞溶解液の 570 nm の吸光度を測定した。化合物非存在下で培養した細胞溶解液と比較し CC_{50} 値を算出した。

1) 新規化合物の抗 HIV-1 活性の評価：MT-2 細胞と実験室野生 HIV-1 株である HIV-1_{LAI} を用い、MTT assay にて評価を行なった。96-well plate にて新規化合物を 10%FCS+ RPMI で 1 μM から段階希釈し、次いで $2 \times 10^4/\text{ml}$ の MT-2 細胞と 100 TCID_{50} の HIV-1_{LAI} を添加、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 7 日間培養した。MTT 試薬 (nacalai tesque) を添加後に 2 時間インキュベート、可溶化溶液を添加し細胞溶解液の 570 nm の吸光度を測定した。化合物非存在下で培養した細胞溶解液と比較し IC_{50} 値を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、株化された細胞株と実験室株の HIV-1 を用いているため倫理面への特別な配慮は必要が無いと判断した。

C. 研究結果

本事業の分担研究者である井本博士のグループにより合成された 11 種の新規化合物について抗ウイルス活性と細胞毒性を評価した。抗 HBV 活性は IC_{50} 値が 0.04 から $>1 \mu\text{M}$ (ETV は 0.00038 μM)、抗 HIV-1 活性は 0.079 から $>1 \mu\text{M}$ (AZT は 0.033 μM)、細胞毒性は 39 から 100 μM 以上であった。本検討において ETV および AZT はそれぞれ標的とするウイルスにのみ活性が見られたが、活性を検討した化合物の中には両ウイルスに対して活性を有するものが見られた。

D. 考察

今回評価を行った 11 種類の化合物について、抗 HBV 活性は ETV ほど高い活性は見られなかった。また抗 HIV-1 活性については、AZT と同等の活性を有するものが見られた。活性が認められた化合物については、薬剤耐性 HBV, HIV 変異体に対する活性やミトコンドリア障害の程度を更に評価する必要がある。また化合物の構造と活性との相関関係から、更に化合物の再デザイン・最適化を行う必要があると思われる。

E. 結論

11 種類の新規化合物について抗 HBV 活性、抗 HIV-1 活性および細胞毒性について検討、評価を行った。これまでに合成された化合物の構造と抗ウイルス活性とを比較することで、最適化を行い、高い抗ウイル

ス活性且つ良好な細胞毒性を示す化合物の
合成展開が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi H, Takamune N, Nirasawa T, Aoki M, Morishita Y, Das D, Koh Y, Ghosh AK, Misumi S, Mitsuya H.

Dimerization of HIV-1 protease occurs through two steps relating to the mechanism of protease dimerization inhibition by darunavir.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 19;111(33):12234-9.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業
分担研究報告書

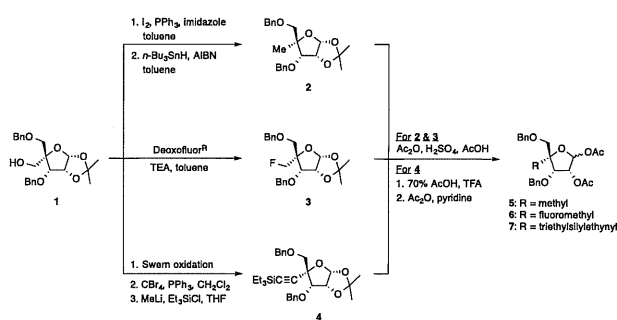
HBVの逆転写酵素の阻害作用を有するヌクレオシドの設計と合成に関する研究

研究分担者 向後 悟（国立国際医療研究センター）

研究要旨：今年度は、以下の5つの研究テーマを実施した。1) 4'-置換-2'-デオキシプリンヌクレオシド誘導体の合成、2) 4'-置換-2'-デオキシピリミジンヌクレオシド誘導体の合成、3) 炭素環ヌクレオシド誘導体の合成

A. 研究目的

本研究は、現在世界で広く用いられている HBV の核酸系逆転写酵素阻害剤 (RTIs) である entecavir (ETV) 等と同等あるいは更に強力で、かつ耐性プロフィールが ETV 等とは異なり、耐性発現の出現を許さない (又は著しく遅延させる) 新規薬剤をデザイン・合成を目的とする。



Scheme 1

B. 研究方法

1) 4'-置換-2'-デオキシプリンヌクレオシド誘導体の合成

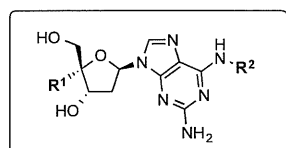
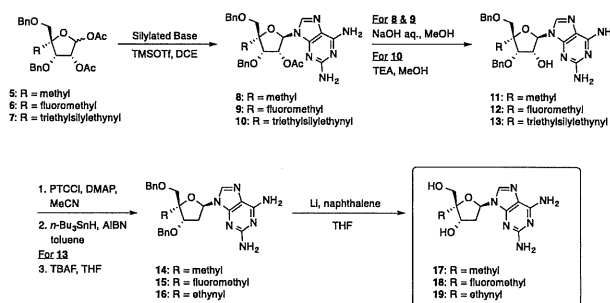


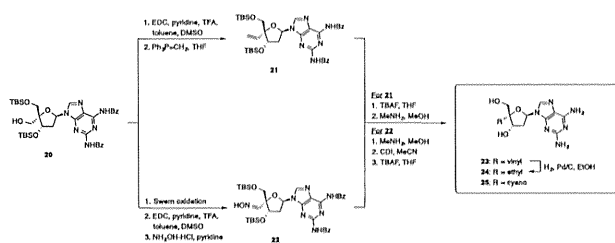
Figure 1

種々の 4'位置換ヌクレオシドが抗 HBV 活性を示すことが明らかとなっているが、同時に細胞毒性が高いこと等が問題となっていた。そこで、Figure 1 に示した 4'位置換構造を基本骨格として、その R¹, R² を様々な置換基へと変換した誘導体を合成し、これら化合物の抗 HBV 活性、及び細胞毒性等の問題を解決できるかを検証する。



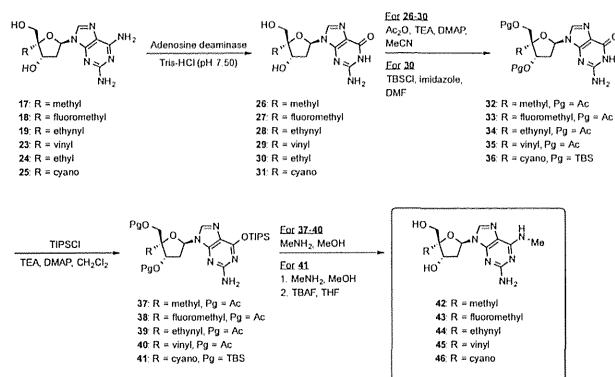
Scheme 2

化合物 (1) を対応する 4'-メチル (5)、4'-フルオロメチル (6)、4'-トリエチルシリルエチニル (7) 誘導体へと変換し、それぞれを 2-アミノアデニンと縮合することにより化合物 (8-10) とする。これらの 2'位水酸基を還元後、脱保護を行うことにより、4'-メチル (17)、4'-フルオロメチル (18)、4'-エチニル (19) 2-アミノアデノシン誘導体を合成する (Scheme 1 & 2)。

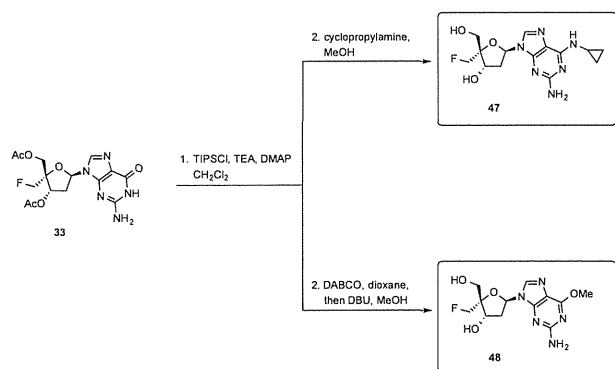


Scheme 3

4'-ビニル (23)、4'-シアノ (25) 誘導体については、化合物 (20) を出発原料とし、その 4'-ヒドロキシメチル基をシアノ基、ビニル基へと変換後、脱保護を行うことにより合成する。また、4'-エチル誘導体 (24) については、4'-ビニル誘導体 (23) の還元により合成する (Scheme 3)。



Scheme 4



Scheme 5

得られた 4'-置換 2-アミノアデノシン誘導体 (17-19、23-25) は、アデノシンデアミナーゼによる脱アミノ化反応により対応するグアノ

シン誘導体 (26-31) とした。さらに、これらの水酸基を保護した後、塩基部 6 位を活性化し、種々の求核剤と反応させることにより、対応する塩基部 6 位の置換体 (42-48) を合成する (Scheme 4 & 5)。

2) 4'-置換-2'-デオキシピリミジンヌクレオシド誘導体の合成

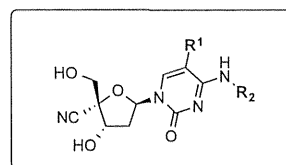
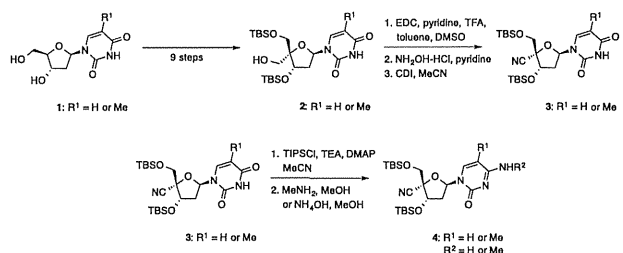


Figure 2

4'位置換 2-アミノプリン誘導体の N⁶ 位を置換することにより細胞毒性が低下する知見が得られている。この結果をピリミジン誘導体に適用できるか検証するため、Figure 2 に示した化合物の合成を行う。



Scheme 6

市販の 2'-デオキシウリジン、チミジン (1) を既知の方法に従い化合物 (2) へと誘導する。この化合物の 4'-ヒドロキシメチル基をシアノ基へと変換した後、塩基部 4 位を活性化し、これに種々のアミンを反応させることにより、N⁴-置換ピリミジンヌクレオシド誘導体を合成する (Scheme 6)。

3) 炭素環ヌクレオシド誘導体の合成

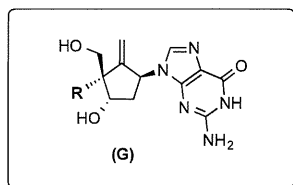
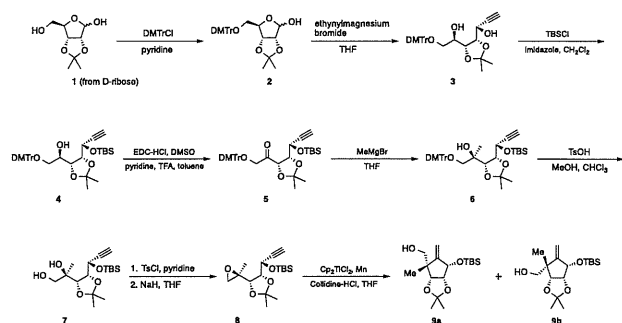
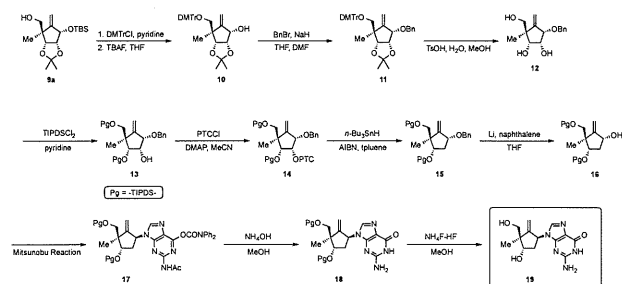


Figure 3

既存の抗 HBV 剤であるエンテカビル[®]の活性増強等の効果を期待し、4'位置換エンテカビル (Figure 3) の合成を行う。



Scheme 7



Scheme 8

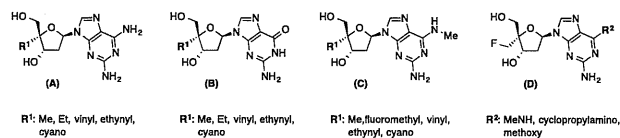
リボース誘導体 (1) を原料とし、7 工程でエポキシド (8) を合成する。これをラジカル的に環化させることで 4'-メチルエンテカビルの骨格 (9a) を形成する。さらに数工程をかけて 2'位に対応する位置の水酸基を還元して化合物 (15) とし、これに塩基を導入後、脱保護を行って目的とする 4'-メチルエンテカビル (19) とする。

(倫理面への配慮)

化学合成研究であることから、倫理面への配慮には該当しない。

C. 研究結果

1) 4'-置換-2'-デオキシプリンヌクレオシド誘導体の合成



上記の 4 種 (A-D) の化合物群 (4'位にメチル、エチル、ビニル、エチニル、シアノ基を有する 2'-アミノアデノシン誘導体 (A)、グアノシン誘導体 (B)、4'位にメチル、フルオロメチル、ビニル、エチニル、シアノ基を有する N⁶-メチル-2'-アミノアデノシン誘導体 (C)、4'位にフルオロメチル基を有する N⁶-シクロプロピル、及び 6-メトキシ誘導体 (D)) を合成し、生物活性検定に供した。

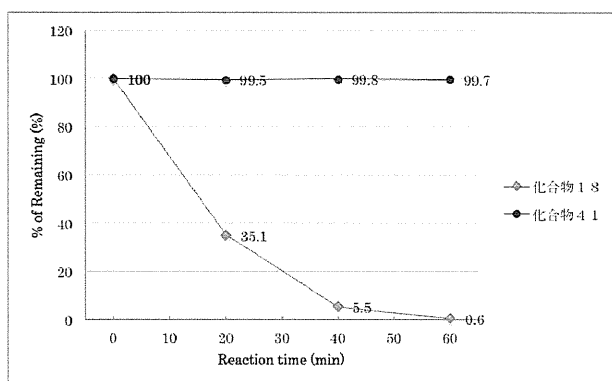
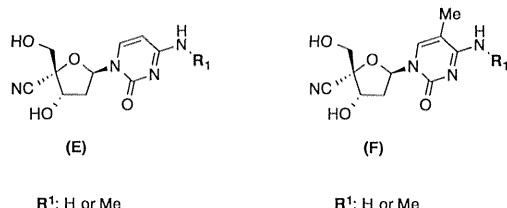


Figure 4

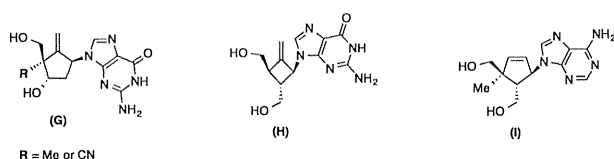
また、本テーマ検討中に化合物群 (C) の誘導体の多くが低毒性であることが明らかになった。その理由として、これら誘導体がアデノシンデアミナーゼによる脱アミノ化反応を受けないためと考え、実際に本酵素による作用を受けないことが明らかにした (Figure 4)。

2) 4'-置換-2'-デオキシピリミジンヌクレオシド誘導体の合成



上記の2種 (E-F) の化合物群を合成し、生物活性検定に供した。

3) 炭素環ヌクレオシド誘導体の合成



4'位にメチル基を有するエンテカビル誘導体 (G) を合成し、生物活性検定に供した。別法 (詳細は省略) により 4'-シアノエンテカビルの合成にも成功した。さらに4'位の置換基として、エチニル基、フルオロメチル基、ビニル基を有する誘導体の合成を検討中。

エキソメチレン基を有する炭素環オキセタノシン誘導体 (H)、4'位にメチル基を有する BCA 誘導体の合成 (詳細は省略) にも成功した。

D. 考察

4'-置換-2'-デオキシプリンヌクレオシド誘導体 17 検体、4'-置換-2'-デオキシピリミジンヌクレオシド誘導体 4 検体、炭素環ヌクレオシド誘導体 4 検体を合成した。

化合物群 (A)、(B) は細胞毒性が強いが、化合物群 (A) の N⁶ 位を置換した化合物群 (C) は劇的に細胞毒性が低下することがわかった。恐らく化合物群 (C) はアデノシンデアミナーゼによる脱アミノ化を受けず、細胞毒性の高いグアニン誘導

体へと変換されないのが理由と考えられる。しかしながら、化合物群 (C) のなかで最も抗 HBV 活性の高い化合物 (46) は、動物レベルの実験で副作用が見られた。原因は不明である。一方、ピリミジン誘導体の N⁶ 置換誘導体 (F) には抗 HBV 活性は認められなかった。

炭素環ヌクレオシド誘導体 (G-H) は、優れた抗 HBV 活性の期待できる骨格であり、その合成法の確立が急務であると考えられる。今回、エンテカビルの 4'-メチル体の合成に成功したものの、収率、工程数等、改善の余地が多い。引き続き、効率的な合成法の確立を目指し、検討を続けたい。

E. 結論

4'-置換-2'-デオキシプリンヌクレオシド誘導体については、課題となっていた細胞毒性の問題に目処がついたものの、新たに動物レベルでの副作用という問題が出現した。その原因を明らかとし、本化合物を今後どのように進めるかの判断が必要である。

その他の誘導体として、4'-メチルエンテカビルに強い抗 HBV 活性が見られており、これら炭素環ヌクレオシド誘導体が有望な骨格になりうると考えられる。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
無し。
2. 学会発表
無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
研究テーマ 1 に関して、特許出願を準備中。
2. 実用新案登録
無し。
3. その他
無し。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年	PDF ページ数
Takamatsu, Y., Tanaka, Y., <u>Kohgo, S.</u> , Murakami, S., Singh, K., Das, D., Venzon, DJ., Amano, M., Kuwata, N., <u>Aoki, M.</u> , Delino, NS., Hayashi, S., Takahashi, S., <u>Haraguchi, K.</u> , Sarafianos, SG, Maeda, K., and <u>Mitsuya, H.</u>	4'-Modified Nucleoside Analogs: Potent Inhibitors Active against Entecavir-resistant HBV.	<i>HEPATOLGY</i>	Under Revision		2015	
Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Ishima Y, <u>Otagiri M.</u> Maruyama T.	Carbon monoxide-bound red blood cell resuscitation ameliorates hepatic injury induced by massive hemorrhage and red blood cell resuscitation via hepatic cytochrome P450 protection in hemorrhagic shock rats.	<i>J Pharm Sci.</i>	103(7)	2199-2206	2014	8
Maeda H, Hirata K, Watanabe H, Ishima Y, Chuang VT, Taguchi K, Inatsu A, Kinoshita M, Tanaka M, Sasaki Y, <u>Otagiri M.</u> Maruyama T	Polythiol-containing, recombinant mannosylated-albumin is a superior CD68+/CD206+ Kupffer cell-targeted nano-antioxidant for the treatment of two acute hepatitis models.	<i>J Pharmacol Exp Ther.</i>	352(2)	244-257	2015	14
Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, <u>Enomoto N.</u> Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsuhashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y	Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C.	<i>Hum Genet.</i>	134(3)	279-289	2015	11

Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, <u>Enomoto N</u> , Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K.	Hallmarks of hepatitis C virus in equine herpesvirus.	<i>J Virol.</i>	88(22)	13352-13366	2014	15
Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, <u>Enomoto N</u> .	Liver stiffness measurement for risk assessment of hepatocellular carcinoma.	<i>Hepatol Res.</i>		Epub ahead of print	2014	10
Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takanashi S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, <u>Enomoto N</u> .	Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection.	<i>Hepatol Res.</i>		Epub ahead of print	2014	29
Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, <u>Enomoto N</u> .	Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging.	<i>Hepatol Res.</i>	44(13)	1339-1346	2014	27
Imoto, S., <u>Kohgo, S.</u> , Tokuda, R. Kumamoto, H., Aoki, M., Amano, M., Kuwata-Higashi, N., Mitsuya, H., <u>Haraguchi, K.</u>	Design, Synthesis and Evaluation of Anti-HBV Activity of Hybrid Molecules of Entecavir and Adefovir: Exomethylene Acycloguanine Nucleosides and its Monophosphate Derivatives.	<i>Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids</i>	34	In press	2015	26
Wong DK, Kopaniszen M, <u>Omagari K</u> , <u>Tanaka Y</u> , Fong DY, Seto WK, Fung J, Huang FY, Zhang AY, Hung IF, Lai CL, Yuen MF.	Effect of hepatitis B virus reverse transcriptase variations on entecavir treatment response.	<i>J Infect Dis.</i>	210(5)	701-707	2014	7
Isogawa M, <u>Tanaka Y</u> .	Immunobiology of hepatitis B virus infection.	<i>Hepatol Res.</i>	45(2)	179-189	2015	11

Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, <u>Tanaka Y.</u>	Postexposure Prophylactic Effect of Hepatitis B Virus (HBV)-Active Antiretroviral Therapy against HBV Infection.	<i>Antimicrob Agents Chemother.</i>	59(2)	1292-1298	2015	7
Matsumoto A, Yatsunashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, <u>Tanaka Y.</u> Umemura T, Tanaka E.	Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleoside/nucleotide analog treatment in patients with chronic hepatitis B.	<i>Hepatol Res.</i>	in press		2015	8
日下部篤宣, <u>田中靖人</u> , 飯尾悦子, 村上周子 , 松浦健太郎, 新海登 , 宮木知克, 藤原圭, 野尻俊輔, 折戸悦朗, 城卓志.	B型・D型肝炎ウイルス重 複感染による肝障害に対 してペグインターフェロ ンが有効であった1例	肝臓	55(11)	653-660	2014	8
Matsumoto Y, <u>Yasutake Y.</u> , Takeda Y, Tamura T, Yokota A, Wada M	Structural insights into substrate stereospecificity of D-threo-3-hydroxyaspar tate dehydratase from <i>Delftia</i> sp. HT23: a useful enzyme for the synthesis of optically pure L-threo- and D-erythro-3-hydroxyasp artate.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i>		In press	2015	27
Enomoto M, Kitagawa W, <u>Yasutake Y.</u> Shimizu H	Total Synthesis of Aurachins C, D and L, and a Structurally Simplified Analog of Aurachin C.	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i>	78	1324-1327	2014	10

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Carbon Monoxide-Bound Red Blood Cell Resuscitation Ameliorates Hepatic Injury Induced by Massive Hemorrhage and Red Blood Cell Resuscitation via Hepatic Cytochrome P450 Protection in Hemorrhagic Shock Rats

SHIGERU OGAKI,¹ KAZUAKI TAGUCHI,² HIROSHI WATANABE,^{1,3} YU ISHIMA,¹ MASAKI OTAGIRI,^{1,2,4} TORU MARUYAMA^{1,3}

¹Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, Kumamoto, Japan

³Center for Clinical Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

⁴DDS Research Institute, Sojo University, Kumamoto, Japan

Received 7 April 2014; revised 2 May 2014; accepted 9 May 2014

Published online 28 May 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.24029

ABSTRACT: Red blood cell (RBC) transfusions are the gold standard in cases of massive hemorrhage, but induce hepatic ischemia–reperfusion injury, a serious complication associated with hemorrhage and RBC resuscitation. Thus, the development of a novel resuscitable fluid that is not associated with hepatic ischemia–reperfusion injury would be desirable. It was reported that exogenous carbon monoxide (CO) treatment ameliorated hepatic ischemia–reperfusion injury accompanying liver transplantation. This suggests that transfusions with CO-bound RBC (CO-RBC) might protect against hepatic ischemia–reperfusion injury following massive hemorrhage and resuscitation compared with RBC resuscitation. To investigate this, we created a hemorrhagic shock model rat, followed by resuscitation with RBC and CO-RBC. Hepatic ischemia–reperfusion injury and the destruction of hepatic cytochrome P450 (CYP) were significantly ameliorated in the CO-RBC resuscitation group compared with the RBC resuscitation group. The free heme derived from the destruction of hepatic CYP was correlated with hepatic oxidation and injury, suggesting that CO-RBC was a major factor in the amelioration of hepatic ischemia–reperfusion injury induced by hemorrhage and resuscitation via hepatic CYP protection. These results indicate that CO-RBC has potential for use as a resuscitative fluid in blood transfusion and does not suffer from the limitations associated with the RBC transfusions that are currently in use. © 2014 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 103:2199–2206, 2014

Keywords: cytochrome P450; pharmacokinetics; drug transport; hepatic metabolism; drug effects

INTRODUCTION

Hemorrhagic shock, resulting from massive blood loss, is a pathophysiological state in which the circulatory system is not able to meet its oxygen requirements and to adequately perfuse tissues. The mortality rate associated with severe bleeding can be very low, provided an appropriate treatment is established in a timely manner. Hence, it is important to rapidly control bleeding, to replace circulating volume, and to recover oxygen-carrying capacity. Red blood cell (RBC) transfusions are currently the gold standard in cases of persons who are in a state of hemorrhagic shock. Such a procedure ensures survival and greatly contributes to human health and welfare. However, it is known that systemic ischemia–reperfusion that could cause damages to organs, such as liver, can be induced by standard resuscitation (RBC transfusion) from a massive hemorrhage.¹ Therefore, RBC transfusion-induced ischemia–reperfusion is one of the major deleterious factors that affect the maintenance

of homeostasis. Therefore, the development of an alternative RBC transfusion that can achieve, not only resuscitation from shock, but also organ protection from ischemia–reperfusion would be highly desirable.

Carbon monoxide (CO) inhalation or the pharmacological application using CO-releasing molecules (CORMs) have been reported to ameliorate local ischemia–reperfusion injury accompanied by certain diseases, such as organ transplantation, in liver, kidney, heart, and so on,^{2–4} because CO, when applied at low concentrations, possesses a variety of physiological activities including anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activities.^{5,6} This suggests that CO, when administered in combination with resuscitative fluids, could be used to prevent organ damage caused by ischemia–reperfusion injury, even in the case of resuscitation from hemorrhagic shock via RBC transfusion. However, under conditions of hemorrhagic shock, immediate attention is needed. Therefore, CORMs and inhaled CO would not be applicable for use in emergency medical care, especially massive bleeding, from a clinical perspective for the following reasons: (1) CORMs rapidly liberate CO, with a half-life of 1–21 min,⁷ indicating that the repeated administration of CORMs would be required to achieve a sustainable therapeutic effect of CO. (2) Special equipment would be needed in the case of inhaled CO to control carboxyhemoglobin levels, which can cause CO toxicity.⁸ Thus, it should be noted that an alternative CO donor would be essential for the successful application of CO, even in an emergency situation. One of the

Abbreviation used: RBC, red blood cells; CO, carbon monoxide; CORMs, CO-releasing molecules; CO-RBC, carbon monoxide-bound red blood cell; CYP, cytochrome P450; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; NOx, nitrogen oxide; NO₂[−]/NO₃[−], nitrate/nitrite; MDA, malondialdehyde; ROS, reactive oxygen species.

Correspondence to: Toru Maruyama (Telephone: +81-96-361-4150; Fax: +81-96-362-7690; E-mail: tomaru@gpo.kumamoto-u.ac.jp)

Shigeru Ogaki and Kazuaki Taguchi contributed equally to this work.

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 103, 2199–2206 (2014)

© 2014 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association

current promising agents for overcoming this issue is CO-bound RBC (CO-RBC).

Fortunately, as CO easily and stably binds to hemoglobin in RBC, RBC represents a leading candidate for use as a carrier of CO. This characteristic of CO enables CO-RBC to be easily and rapidly prepared by bubbling CO gas through the RBC resuscitative fluid for 5 min.⁹ In addition, we and other groups previously prepared CO-RBC, and showed that CO-RBC could be an effective resuscitative fluid as RBC with no adverse or toxic effects.^{9–11} These findings led us to hypothesize that CO-RBC would offer great potential for use as an effective resuscitative fluid with organ-protective function against ischemia–reperfusion tissue injury induced by hemorrhage and resuscitation. However, there is no report about the detailed effects of CO-RBC on ischemia–reperfusion tissue injury induced by hemorrhage and resuscitation, because the aforementioned studies limited the utility evaluation as RBC alternative preparation including its influence on blood pressure, laboratory parameters, microhemodynamics, survival, and pharmacokinetics of substrate drugs for limited cytochrome P450 (CYP) isoform in rodent model of hemorrhagic shock.^{9–11}

The present study was designed to test the hypothesis that CO-RBC has potential for use as an RBC alternative preparation for limiting ischemia–reperfusion tissue injury induced by RBC transfusion. For this purpose, we focused on the use of hemorrhagic shock model rats, and examined (1) whether CO-RBC transfusion protects against hepatic injury and the expression of CYP and (2) how CO-RBC transfusion contributes to the beneficial effects compared with a standard RBC transfusion.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Hemorrhagic Shock Model Rats and Resuscitation from Hemorrhagic Shock

All animal experiments were performed according to the guidelines, principles, and procedures for the care and use of laboratory animals of Kumamoto University. Forty-five male SD rats (180–210 g, Kyudou Company, Kumamoto, Japan) were anesthetized and polyethylene catheters (PE 50 tubing, outer diameter equal to 0.965 mm, and an inner diameter equal to 0.58 mm; Becton Dickinson and Company, Tokyo, Japan) containing saline and heparin were then introduced into the left femoral artery. Hemorrhagic shock was induced in 30 rats by removing 40% of the total blood volume according to a previous report.^{12,13} The systemic blood volume was estimated to be 56 mL/kg.¹⁴ Under these experimental conditions, the mean arterial pressure remained at less than 40 mm Hg for 30 min. The hemorrhagic shock rats were resuscitated by an infusion of RBC ($n = 15$) or a CO-RBC ($n = 15$) resuscitative fluid at a rate of 1 mL/min. The RBC and CO-RBC resuscitative fluid was prepared as described in a previous report.⁹ The hemoglobin concentration of the RBC and CO-RBC resuscitative fluid were adjusted to 10 g/dL. The volume of the infused resuscitative fluids was equal to 40% of the total blood volume (22.4 mL/kg) at the baseline. After resuscitation from shock, the femoral artery was ligated, and the skin was sutured with a stitch. In addition, 15 rats were performed prewritten operation without removing blood and resuscitation, which were subjected to a sham group. All animals were maintained in a temperature-controlled room

with a 12-h dark/light cycle and *ad libitum* access to food and water. All of the rats that were resuscitated by both RBC and CO-RBC survived until the end of the experiments. Moreover, the CO-RBC resuscitative fluid group showed no signs of hypoxia or abnormal behavior after resuscitation.

Blood Sampling and Measurement of Serum Chemistry

At stipulated times (0, 1, 2, 4, 6, 12, and 24 h) after resuscitation, blood samples for serum chemistry analysis were obtained from the tail veins of ether-anaesthetized rats [sham ($n = 5$), RBC ($n = 5$), and CO-RBC ($n = 5$)]. The collected venous blood samples were centrifuged (1710g, 10 min) to obtain serum, which was used for the evaluation of serum chemistry [aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)]. AST and ALT activities levels were determined by using a transaminase C-II test kit from Wako Chemicals (Saitama, Japan).

Sample Collection for the Measurement of Nitrate/Nitrite, Oxidative Stress in Liver, Hepatic-Free Heme, and CYP Contents

At 1 h after resuscitation from hemorrhage, the vena cava of the sham rats ($n = 5$), rats resuscitated by both RBC ($n = 5$) and CO-RBC ($n = 5$), was cannulated with a polyethylene catheter (diameter = 0.9 mm), and the liver was perfused with 1.15% KCl after collecting blood samples. The collected blood and liver were preprocessed and nitrate/nitrite ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) in plasma and liver, malondialdehyde (MDA) in liver, hepatic-free heme, and CYP content were measured.

In Vivo Measurement of NOx

The collected blood was centrifuged, and 100 μL of plasma were used for this study. The livers were homogenized using BioMashaer. NOx (NO_2^- and NO_3^-) levels were measured by an automated NO detector high-performance liquid chromatographic system (ENO-10; Eicom, Kyoto, Japan), and NOx, the oxidative metabolites of NO, were quantified by the Griess reaction as described in a previous report.¹⁵

Evaluation of Oxidative Stress in Liver

Malondialdehyde, as an index of the extent of lipid peroxidation in liver, was determined by means of a TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan) following the manufacturer's instructions.

Measurement of Hepatic-Free Heme

The collected liver was homogenized (1000 rpm, 5 min, on ice) using a homogenizer (Ikemoto Scientific Technology, Tokyo, Japan) in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP40, 10 mM Tris-HCl, protease inhibitor cocktail, pH 7.4). The supernatant was collected after centrifuging (6000 rpm, 10 min, 4 °C). Free heme in liver was determined by means of a Heme Assay Kit (Cayman Chemical Company) following the manufacturer's instructions.

Evaluation of Hepatic CYP Content

The collected liver was homogenized (1000 rpm, 5 min, on ice) using a homogenizer (Ikemoto Scientific Technology, Tokyo, Japan) in lysis buffer (0.23 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 50x protease inhibitor cocktail, pH 7.4). Subsequently, the supernatant was collected

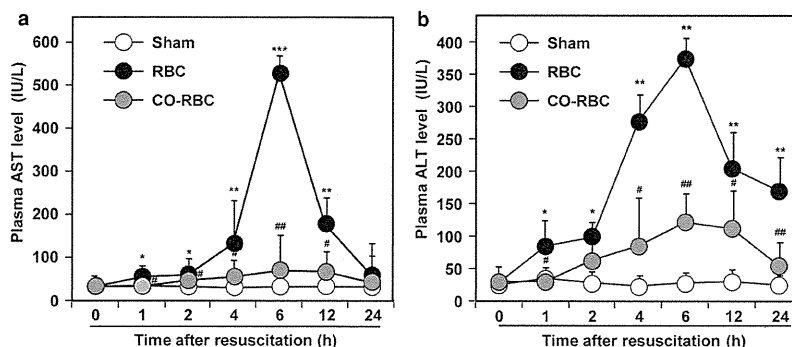


Figure 1. Time course for plasma levels of AST (a) and ALT (b) in sham (open circles) and hemorrhagic shock rats after resuscitation by RBC (closed circles) or CO-RBC (gray circles). The values are means \pm SD ($n = 5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus sham group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus RBC group.

after centrifuging (10,000g, 30 min, 4°C). Then, the precipitation was collected by super centrifuging as microsomes (105,000g, 30 min, 4°C). Microsomal P450 contents were determined spectrophotometrically as described in a previous report.¹⁶

The Pharmacokinetic Experiment Protocol with Dapsone

Sham rats ($n = 5$), rats resuscitated by both RBC ($n = 5$) and CO-RBC ($n = 5$) were used in pharmacokinetic experiments. The pharmacokinetic experiments using the dapsone (Alexis Company, Lausen, Switzerland), a multiple CYP probe, were performed as described in a previous report.¹⁷ At 1 h after resuscitation from hemorrhage, dapsone (100 μ mol/kg) was administered to each rat via the tail vein. Blood samples were collected at multiple time points after the injection of dapsone (5, 15, and 30 min and 1, 2, 4, 6, 12, and 24 h) and the plasma was separated by centrifugation (3000g, 5 min, 4°C). The concentration of dapsone and hydroxylaminodapsone in plasma was determined by HPLC according to a previous report.¹⁷ The HPLC system consisted of a Hitachi L-6000 pump, a Hitachi L-4000 UV detector operated at 295 nm, and a Hitachi D-2500 Chromato integrator. Liquid chromatography analyses were carried out on a COSMOSIL 5C₁₈-MS-II Waters (150 \times 4.6 mm² i.d., particle size 5 μ m).

Data Analysis

A two-compartment model was used to determine the pharmacokinetic parameters after administering the dapsone. Pharmacokinetic parameters were estimated by curve fitting using MULTI, a normal least-squares program.¹⁸ Data are shown as the means \pm SD for the indicated number of animals. Significant differences among each group were examined using the Student's *t*-test. The Spearman test was used for the correlation analysis. A probability value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Effect of CO-RBC Transfusion on Hepatic Ischemia-Reperfusion

Although ischemia-reperfusion injury occurs systemically in many organs during an RBC transfusion for a massive hemorrhage, it is well known that ischemia-reperfusion injury in the

liver is a major complication associated with hemorrhage and resuscitation. Therefore, we focused on the liver in our investigation of the effect of CO-RBC on ischemia-reperfusion injury accompanied by hemorrhage and resuscitation focusing in this study.

At first, to evaluate the effect of CO-RBC on hepatic protection, AST and ALT, which reflect hepatic injury, were determined up to 24 h after resuscitation. As shown in Figure 1, AST and ALT levels were significantly increased in the RBC resuscitation group compared with that in sham group. On the contrary, these parameters were suppressed in the CO-RBC resuscitation group (Figs. 1a and 1b). Moreover, to investigate whether CO-RBC attenuated the induction of ischemia-reperfusion, we evaluated the nitrogen oxide (NO_x; NO₂⁻ and NO₃⁻) levels in the plasma and liver, which are increased in the case of a hemorrhage and resuscitation-induced hepatic injury following ischemia-reperfusion.¹⁹ As a result, NO_x levels in both the plasma and liver were significantly decreased in the CO-RBC resuscitation group compared with the RBC resuscitation group (Figs. 2a and 2b). These data indicate that the CO-RBC transfusion attenuated the hepatic injury induced by ischemia-reperfusion and RBC resuscitation following a massive hemorrhage.

Expression of Hepatic CYP Protein

To evaluate the effect of resuscitative fluids on hepatic CYP levels, the expression levels of the hepatic CYP protein were determined by spectrophotometrical analysis. At 1 h after resuscitation, the expressions of CYP in the RBC resuscitation group were significantly decreased compared with the sham group, whereas the expression of CYP was maintained in the CO-RBC resuscitation group (Fig. 3a). In addition, we further determined the hepatic-free heme concentration, because CYP, which is a heme protein, may release free heme after its destruction. As shown in Figure 3b, the level of free heme in liver was dramatically increased in the RBC resuscitation group, whereas the level in the CO-RBC resuscitation group remained constant 1 h after resuscitation. Furthermore, the level of free heme in the liver was negatively correlated with the expression of CYP protein (Fig. 3c; $r = 0.73$, $p < 0.01$). These data confirm that the changes of the free heme level in the liver after hemorrhage and resuscitation can be attributed to alterations in the expression of hepatic CYP.

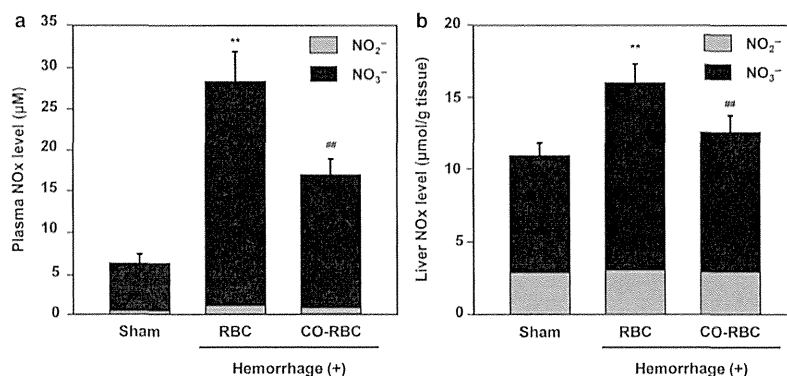


Figure 2. The nitrogen oxide (NOx; NO₂⁻ and NO₃⁻) levels in plasma (a) and liver (b) in sham and hemorrhagic shock rats at 1 h after resuscitation by RBC or CO-RBC. The values are means \pm SD ($n = 5$). ** $p < 0.01$ versus sham group. ## $p < 0.01$ versus RBC group.

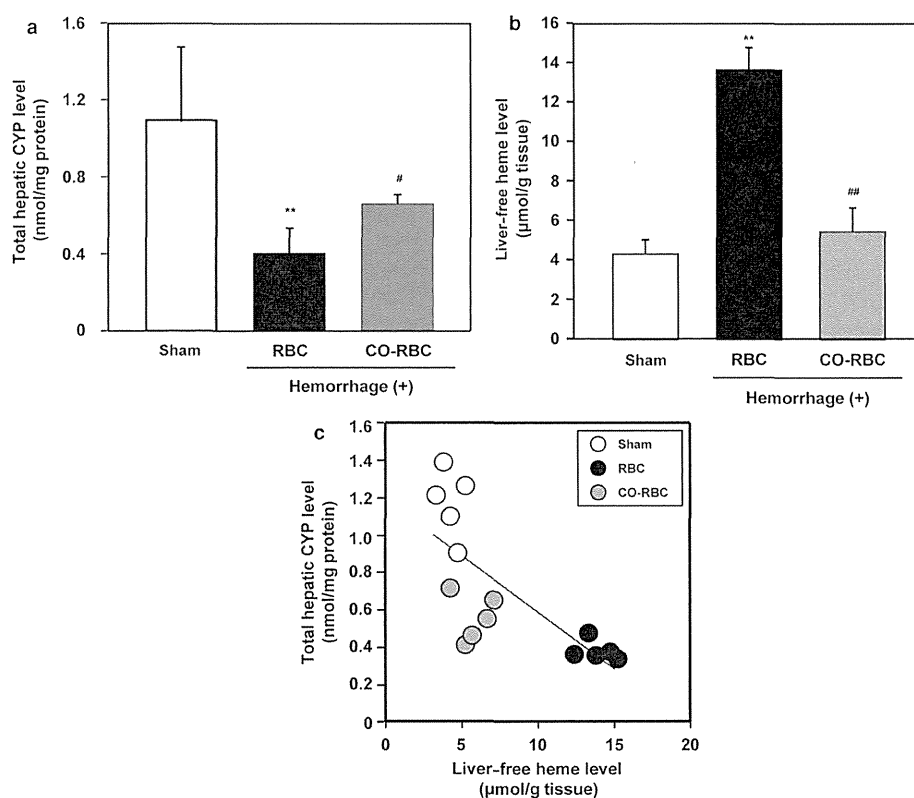


Figure 3. Level of total hepatic CYP (a) and free heme in liver (b) in sham and hemorrhagic shock rats at 1 h after resuscitation by RBC or CO-RBC. (c) Relationship between the level of liver-free heme and total hepatic CYP contents to sham (opened circles) and hemorrhagic shock rats at 1 h after resuscitation by RBC (closed circles) or CO-RBC (gray circles). The values are means \pm SD ($n = 5$). ** $p < 0.01$ versus sham group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus RBC group. The linear regression of logarithmic values was calculated using the least-squares method ($y = -0.06x + 1.19$, $r = 0.73$, $p < 0.01$).

Effect of Free Heme After Hemorrhage and Resuscitation on Adverse Effects in Liver

It is well known that an excess of heme (iron) can cause the production of reactive oxygen species (ROS) via the Fenton reaction.²⁰ Therefore, we evaluated the level of lipid peroxidation, MDA, in the liver. The MDA levels in the RBC resuscitation group were significantly increased compared with that

in the sham group, whereas only a slight increase was found for the CO-RBC resuscitation group (Fig. 4a). Furthermore, to evaluate whether ROS derived from free heme is related to tissue oxidation, the correlation between MDA levels and free heme level in the liver was investigated. As shown in Figure 4b, the MDA levels in the liver were significantly correlated with the levels of free heme in the liver ($r = 0.89$, $p < 0.01$). Interestingly, a good correlation between plasma ALT level and free